



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 A61K 38/18 // C21N 15/12, C07K 14/495	A1	(11) 国際公開番号 WO00/07614
		(43) 国際公開日 2000年2月17日(17.02.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04171		
(22) 国際出願日 1999年8月2日(02.08.99)		
(30) 優先権データ 特願平10/221886 特願平11/29164	1998年8月5日(05.08.98) 1999年2月5日(05.02.99)	JP JP
(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について） 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒101-8535 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP)		光本泰秀(MITSUMOTO, Yasuhide)[JP/JP] 〒770-0861 徳島県徳島市住吉6丁目6-33-601 Tokushima, (JP) 森 厚詞(MORI, Atsushi)[JP/JP] 〒770-0861 徳島県徳島市住吉4丁目9-3-605 Tokushima, (JP) 渡部昭仁(WATANABE, Akihito)[JP/JP] 〒771-0144 徳島県徳島市川内町榎瀬669-13 Tokushima, (JP)
(72) 発明者；および (75) 発明者／出願人（米国についてのみ） 堀江正人(HORIE, Masato)[JP/JP] 〒772-0051 徳島県鳴門市鳴門町高島字南261 Tokushima, (JP) 平野尚伸(HIRANO, Hisanobu)[JP/JP] 〒771-0212 徳島県板野郡松茂町中喜来字福有開拓77-18 Tokushima, (JP) 急式弘之(KYUSHIKI, Hiroyuki)[JP/JP] 〒771-0117 徳島県徳島市川内町鶴島377-1-1301 Tokushima, (JP)		(74) 代理人 弁理士 三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP)
		(81) 指定国 AU, CA, CN, KR, MX, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)
		添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title: REMEDIES FOR NERVE DEGENERATION DISEASES

(54) 発明の名称 神経変性疾患治療剤

(57) Abstract

Drugs exhibiting a therapeutic effect on nerve degeneration diseases such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease, muscular hypoplastic lateral sclerosis, Huntington's disease, brain infarction and traumatic nerve degeneration, characterized by containing a protein containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 as the active ingredient.

本発明は、パーキンソン病、アルツハイマー病、筋発育不全性側索硬化症、ハンチントン病、脳梗塞、外傷性神経変性疾患などの神経変性疾患に対する治療効果を奏する薬剤であって、配列番号：1で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質を有効成分として含有することを特徴とする神経変性疾患治療剤を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スードン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルク	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジ兰ド
BF	ブルギニア・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴー
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサオ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	共和国		TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダッド・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジエール	VN	ヴィエトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YC	ユゴースラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

神経変性疾患治療剤

技術分野

本発明は、神経変性疾患治療剤に関する。

5

背景技術

- 初代培養ドパミン神経細胞に対して神経栄養因子様効果を示すペプチド性因子の代表的なものに、 G D N F (glial cell line-derived neurotrophic factor)、 B D N F (brain-derived neurotrophic factor)、
10 b F G F (basic fibroblast growth factor)、 E G F (epidermal growth factor)などがある。特に、 G D N F はこの中で最も強力なドパミン神経細胞に対する栄養因子であり、黒質線条体ドパミン神経の変性脱落を伴うパーキンソン病に対する治療効果が期待されている。
- 15 しかしながら、上記ペプチド性因子などの医薬用途への適用やこれによる薬理効果の研究は、始まったばかりであり、いまだ充分なデータは蓄積されておらず、それらの治療剤としての有効性についても殆ど報告はない。
- 上記 G D N F などの培養ドパミン神経細胞に対して神
20 経栄養因子的に作用するペプチド性因子と相同性を有する他の蛋白質などが新たに見出されれば、之等は上記パーキンソン病を始めとする神経変性疾患に対する治療薬

としての臨床応用が期待できる。

本発明者らは、以上の観点から、上記ペプチド性因子の同効物乃至これらと相同性を有する他の蛋白質などの研究、開発と共に、それらの有する薬理活性につき、従
5 来より鋭意研究を重ねてきた。

その過程で、以前にヒト胎児脳 c D N A ライブラリーから新たに単離した、膜蛋白質(transmembrane protein)遺伝子 T M P - 2 を保有するクローン(「G E N - 0 9 2 E 1 0」と命名、特開平9-308492号公報、米国
10 特許第5831058号明細書参照)から、該遺伝子の特定部分を発現させ、その発現産物について、初代培養ラット中脳ドバミン神経細胞の生存維持に対する効果を検討した結果、これが該神経細胞の生存促進効果を奏し得、従って、神経変性疾患治療効果を奏し得ることを見出
15 した。本発明は、かかる知見に基づいて完成されたものである。

発明の開示

本発明によれば、(a)配列番号：1で示されるアミノ酸配列の蛋白質(以下「T M P - 2 蛋白質」という)
20 の34-318アミノ酸配列部分を含む発現物及び(b)T M P - 2 蛋白質の34-318アミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミ

ノ酸配列部分を含む発現物から選ばれる少なくとも1種の有効成分の有効量を、製剤担体と共に含有することを特徴とする神経変性疾患治療剤が提供される。

特に本発明によれば、上記有効成分が TMP-2 蛋白質の 34-318 アミノ酸配列の発現物である神経変性疾患治療剤、同有効成分が TMP-2 蛋白質の 34-318 アミノ酸配列の C 末端にヒスチジン 6 残基を結合させたものである神経変性疾患治療剤及び同有効成分が TMP-2 蛋白質の 34-318 アミノ酸配列の N 末端にマルトース結合蛋白質を融合させた MBP-TMP-2 融合蛋白質である神経変性疾患治療剤が提供される。

また、本発明によれば、パーキンソン病、アルツハイマー病、筋発育不全性側索硬化症、ハンチントン病、脳梗塞、糖尿病性神経症及び外傷性神経変性疾患の治療に用いられる上記神経変性疾患治療剤が提供される。

更に、本発明によれば、(a) TMP-2 蛋白質の 34-318 アミノ酸配列部分を含む発現物及び (b) TMP-2 蛋白質の 34-318 アミノ酸配列において 1 又は複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列部分を含む発現物から選ばれる少なくとも1種の有効成分の有効量を、処置を要求される患者に投与することを特徴とする神経変性疾患の治療方法が提供され

る。

上記治療方法において、特に好ましい有効成分としては、 TMP - 2 蛋白質の 34 - 318 アミノ酸配列の発現物； TMP - 2 蛋白質の 34 - 318 アミノ酸配列の
5 C 末端にヒスチジン 6 残基を結合させたもの；及び TMP - 2 蛋白質の 34 - 318 アミノ酸配列の N 末端にマルトース結合蛋白質を融合させた MBP - TMP - 2 融合蛋白質を挙げができる。

更に、本発明によれば、(a) TMP - 2 蛋白質の
10 34 - 318 アミノ酸配列部分を含む発現物及び (b)
TMP - 2 蛋白質の 34 - 318 アミノ酸配列において
1 又は複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミ
ノ酸配列部分を含む発現物から選ばれる少なくとも 1 種
の有効成分の、神経変性疾患治療剤の製造のための使用
15 が提供できる。

該使用に特に適した有効成分としては、 TMP - 2 蛋
白質の 34 - 318 アミノ酸配列の発現物； TMP - 2
蛋白質の 34 - 318 アミノ酸配列の C 末端にヒスチジ
ン 6 残基を結合させたもの；及び TMP - 2 蛋白質の
20 34 - 318 アミノ酸配列の N 末端にマルトース結合蛋白質を融合させた MBP - TMP - 2 融合蛋白質を挙げ
ることができる。

本明細書におけるアミノ酸、ペプチド、塩基配列、核酸などの略号による表示は、IUPAC、IUBの規定、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書などの作成のためのガイドライン」（特許庁編）及び当該分野における慣用記号に従うものとする。

以下、本発明治療剤において有効成分とする TMP-2 蛋白質、及びその製造に利用する TMP-2 遺伝子（以下「本発明遺伝子」という）につき詳述する。

本発明遺伝子の一具体例としては、後述する実施例 1 に示されるクローン G E N - 0 9 2 E 1 0 の有する DNA 配列から演繹されるものを挙げることができる。該クローンは、配列番号：1 に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号：2 に示されるヌクレオチド（核酸）のオープンリーディングフレームを含む、配列番号：3 の塩基配列を有している。その計算された分子量は、後記実施例に示されるとおりである。

本発明遺伝子は、例えば配列番号：2 に示されるように一本鎖 DNA 配列で表されるが、かかる一本鎖 DNA 配列に相補的な DNA 配列やこれらの両者を含むコンポーネントであってもよい。尚、配列番号：2 に示す本発明遺伝子の配列は、これによりコードされる各アミノ酸残基を示すコドンの一つの組合せ例であり、本発明遺

伝子はこれに限らず、各アミノ酸残基に対して任意のコドンを組合わせ選択したDNA配列を有することも勿論可能である。該コドンの選択は常法に従うことができ、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮することができる〔Ncl. Acids Res., 9, 43-74 (1981)〕。

本発明遺伝子には、上記で示されるアミノ酸配列の一部のアミノ酸乃至アミノ酸配列を置換、欠失、付加などにより改変してなり、同様の機能を有する同効物（ペプチド）をコードするDNA配列も包含される。これらペプチドの製造、改変（変異）などは天然に生じることもあり、また翻訳後の修飾により収得することができる。また、これらのペプチドは、遺伝子工学的手法により天然の遺伝子（本発明遺伝子）を、例えばサイトスペシフィック・ミュータゲネシス〔Methods in Enzymology, 154, p350, 367-382 (1987)；同100, p468 (1983)；Nucleic Acids Research, 12, p9441 (1984)；続生化学実験講座1「遺伝子研究法II」、日本生化学会編, p105 (1986)〕などの方法により改変したり、リン酸トリエステル法やリン酸アミダイト法などの化学合成手段〔J. Am. Chem. Soc., 89, p4801 (1967)；同91, p3350 (1969)；Science, 150, p178 (1968)；Tetrahedron Lett., 22, p1859 (1981)；同24, p245 (1983)〕により変異させて

得られるDNAを用いて収得することもでき、これら手段の組合せにより収得することもできる。

本発明遺伝子は、次の如くして単離される。即ち、ヒト胎児脳、成人血管、胎盤などの各種組織より抽出した
5 mRNAよりcDNAを合成し、これをベクターに組込んでライブラリーを構築し、該ライブラリーでトランスフォームした大腸菌コロニーを寒天培地上に形成させ、該コロニーをランダムにピックアップして96ウェルマイクロプレートに移し、ヒト遺伝子を含む多数の大腸菌
10 クローンを得る。

得られる各クローンを少量培養後、DNAを抽出精製し、抽出したcDNAを鋳型としてデオキシターミネーター法により4種の塩基特異的に停止する伸長反応を行い、自動DNAシークエンサーにより、遺伝子の5'末端から約400塩基配列を決定する。かくして得られる塩基配列情報について、公知の動植物種に類似性を有するファミリー遺伝子を検索する。

上記cDNA解析方法については、藤原らにより細述されている(藤原 力、細胞工学、14、645-654(1995))。

20 本発明遺伝子は、例えばこれを微生物のベクターに組込み、形質転換された微生物を培養することによって、該遺伝子でコードされる蛋白質を容易にかつ安定して発

現できる。

本発明遺伝子の製造は、より詳しくは、本発明によつて開示された本発明遺伝子についての配列情報に基づいて、一般的遺伝子工学的手法により容易に実施できる

5 [Molecular Cloning 2nd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) ; 続生化学実験講座「遺伝子研究法 I、II、III」、日本生化学会編 (1986) など参照]。

これは、例えばヒト cDNA ライブライリー（各遺伝子の発現される適当な起源細胞より常法に従い調製された
10 もの）から、本発明遺伝子に特有の適当なプローブや抗体を用いて所望クローンを選択することにより実施できる [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78, 6613 (1981) ;
Science, 222, 778 (1983) など]。

上記方法において、起源細胞としては、目的の遺伝子
15 を発現する各種の細胞、組織やこれらに由来する培養細胞などが例示され、これから全 RNA の分離、
mRNA の分離や精製、cDNAへの変換（合成）とその
クローニングなどはいずれも常法に従い実施できる。

また、cDNA ライブライリーは市販されてもおり、本発
20 明においてはそれら cDNA ライブライリー、例えばクロ
ーンテック社 (Clontech Lab. Inc.) より市販の各種
cDNA ライブライリーなどを用いることもできる。

c D N A ライブラリーからの本発明遺伝子のスクリーニングは、前記通常の方法に従い実施できる。該スクリーニング法としては、例えば c D N A の產生する蛋白質に対して、該蛋白質特異抗体を使用した免疫的スクリーニングにより、対応する c D N A クローンを選択する方法、目的の D N A 配列に選択的に結合するプローブを用いたブラークハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーションなどやこれらの組合せを例示できる。

ここで用いられるプローブとしては、本発明遺伝子の D N A 配列に関する情報をもとにして化学合成された D N A 配列などが一般的であり、勿論既に取得された本発明遺伝子やその断片もかかるプローブとして利用できる。

更に各細胞、組織より抽出、単離精製された天然抽出物の部分アミノ酸配列情報に基づき、センス・プライマー、アンチセンス・プライマーをスクリーニング用プローブとして用いることもできる。

また、本発明遺伝子の取得に際しては、 P C R 法 [Science, 230, 1350-1354 (1985)] による D N A / R N A 増幅法が好適に利用できる。殊にライブラリーから全長の c D N A が得られ難いような場合に、レース法 (RACE: Rapid amplification of cDNA ends; 実験医学、

12(6), 35-38 (1994))、殊に5'レース(5'RACE)法(Frohman, M. A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 8, 8998-9002(1988))の採用が好適である。かかるPCR法の採用に際して使用されるプライマーは、既に本発明5によって明らかにされた本発明遺伝子の配列情報に基づいて適宜設定することができ、これは常法に従い合成することができる。

尚、増幅させたDNA／RNA断片の単離精製は前記のとおり常法に従うことができ、例えばゲル電気泳動法10などによればよい。

上記で得られる本発明遺伝子或は各種DNA断片などの塩基配列の決定も、常法に従うことができ、例えばジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467(1977)〕やマキサム-ギルバート法〔Methods in Enzymology, 65, 499 (1980)〕などにより行うことができる。かかる塩基配列の決定は、市販のシークエンスキットなどを用いても容易に行い得る。

本発明遺伝子の利用によれば、通常の遺伝子組換え技術〔例えば、Science, 224, p1431 (1984); Biochem. Biophys. Res. Comm., 130, p692 (1985); Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80, p5990 (1983)及び前記引用文献など参照〕に従い、組換え体蛋白質を得ることができる。

該蛋白質の製造は、より詳細には、本発明遺伝子が宿主細胞中で発現できる組換えDNAを作成し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、該形質転換体を培養することにより行われる。

5 ここで宿主細胞としては、真核生物及び原核生物のいずれも用いることができる。該真核生物の細胞には、脊椎動物、酵母などの細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えばサルの細胞であるCOS細胞〔Cell, 23,
175-182 (1981)〕やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞
10 及びそのジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220 (1980)〕などがよく用いられているが、これらに限定される訳ではない。

脊椎動物の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNAのス
15 プライス部位、ポリアデニル化部位及び転写終了配列などを保有するものを使用でき、これは更に必要により複製起点を有していてもよい。該発現ベクターの例としては、例えばSV40の初期プロモーターを保有する
pSV2dhfr〔Mol. Cell. Biol., 1, 854 (1981)〕
20 などを例示できる。また、真核微生物としては、酵母が一般によく用いられ、中でもサッカロミセス属酵母を有利に利用できる。該酵母などの真核微生物の発現ベクタ

一としては、例えば酸性ホスファターゼ遺伝子に対するプロモーターを有する p A M 8 2 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80, 1-5 (1983)]などを利用できる。

また、本発明遺伝子の発現ベクターとしては、原核生物遺伝子融合ベクターを好ましく利用することができ、該ベクターの具体例としては、例えば分子量 2 6 0 0 0 の G S T ドメイン (S. japonicum 由来) を有する p G E X - 2 T K や p G E X - 4 T - 2などを例示できる。

原核生物の宿主としては、大腸菌や枯草菌が一般によく用いられる。これらを宿主とする場合、例えば該宿主菌中で複製可能なプラスミドベクターを用い、このベクター中に本発明遺伝子が発現できるように該遺伝子の上流にプロモーター及び S D (シャイン・アンド・ダルガーノ) 塩基配列、更に蛋白質合成開始に必要な開始コードン (例えば A T G) を付与した発現プラスミドを利用するのが好ましい。上記宿主としての大腸菌としては、エシエリヒア・コリ (Escherichia coli) K 1 2 株などがよく用いられ、ベクターとしては一般に p B R 3 2 2 及びその改良ベクターがよく用いられるが、これらに限定されず公知の各種の菌株及びベクターをも利用できる。プロモーターとしては、例えばトリプトファン (t r p) プロモーター、l p p プロモーター、l a c プロモーター、

P L / P R プロモーターなどを使用できる。

かくして得られる所望の組換えDNAの宿主細胞への導入方法及びこれによる形質転換方法としては、一般的な各種方法を採用できる。また得られる形質転換体は、

5 常法に従い培養でき、該培養により本発明遺伝子によりコードされる目的の蛋白質が生産、発現される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択利用でき、その培養も宿主細胞の生育に適した条件下で実施できる。

10 上記により、形質転換体の細胞内、細胞外乃至は細胞膜上に目的とする組換え蛋白質が発現、生産、蓄積乃至分泌される。

上記組換え蛋白質は、所望により、その物理的性質、化学的性質などを利用した各種の分離操作〔「生化学データーブックII」、1175-1259頁、第1版第1刷、1980年6月23日株式会社東京化学同人発行；*Biochemistry*, 25(25), 8274-8277 (1986); *Eur. J. Biochem.*, 163, 313-321 (1987) など参照〕により分離、精製できる。該方法としては、具体的には例えば通常の再構成処理、蛋白沈澱剤による処理（塩析法）、遠心分離、浸透圧ショック法、超音波破碎、限外濾過、分子篩クロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換

クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、
高速液体クロマトグラフィー（HPLC）などの各種液
体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せなどを
例示でき、特に好ましい上記方法としては所望の蛋白質
5 を結合させたカラムを利用したアフィニティクロマトグ
ラフィーを例示できる。

尚、本発明によって明らかにされた本発明遺伝子の配
列情報を基にすれば、例えば該遺伝子の一部又は全部の
塩基配列を利用することにより、各種ヒト組織における
10 本発明遺伝子の発現の検出を行うことができる。これは
常法に従って行うことができ、例えばR T - P C R (Rev
erse transcribed-Polymerase chain reaction)
(Kawasaki, E. S., et al., Amplification of RNA. In
PCR Protocol, A Guide to methods and applications,
15 Academic Press, Inc., SanDiego, 21-27(1991))による
RNA增幅により、またノーザンプロッティング解析
(Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory
(1989))などにより、いずれも良好に実施し得る。

前記P C R法を採用する場合において、用いられるプ
20 ライマーは、本発明遺伝子のみを特異的に増幅できる本
発明遺伝子に特有のものである限りなんら限定はなく、
本発明遺伝情報に基いてその配列を適宜設定することが

できる。通常これは常法に従って 15～30 ヌクレオチド程度の部分配列を有するものとすることができます。その好適な例は、後記実施例に示すとおりである。

- 本発明神経変性疾患治療剤の有効成分とする発現物
5 (組換え蛋白質) は、該組換え蛋白質に対する特異抗体を作成するための免疫抗原としても好適に利用できる。かかる抗原の利用により、所望の抗血清 (ポリクローナル抗体) 及びモノクローナル抗体を収得できる。該抗体の製造法自体は、当業者によく理解されており、本発明
10 においてもかかる常法を採用できる [続生化学実験講座 「免疫生化学研究法」、日本生化学会編 (1986) など参考] 。かくして得られる抗体は、例えば上記発現物の精製及びその免疫学的手法による測定乃至識別などに有利に利用できる。
- 15 本発明に係わる神経変性疾患に対する治療剤は、上記発現物を有効成分として、一般的に知られている蛋白製剤の製造と同様にして製造することができる。ここで用いられる有効成分は、(a) TMP-2 蛋白質の 34-318 アミノ酸配列部分を含む発現物及び (b) TMP-2 蛋白質の 34-318 アミノ酸配列において 1 又は複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列部分を含む発現物から選ばれる少なくとも 1 種である
20

ことが重要である。特に好ましい上記発現物には、
TMP-2蛋白質の34-318アミノ酸配列部分の発
現物、TMP-2蛋白質の34-318アミノ酸配列の
C末端にヒスチジン6残基を結合させた組換え蛋白質又
5 は同アミノ酸配列のN末端にマルトース結合蛋白質を融
合させた融合型組換え蛋白質が包含される。また、上記
有効成分とする発現物には、TMP-2蛋白質の34-
318アミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が欠
失、置換又は付加されたアミノ酸配列（改変アミノ酸配
10 列）部分を含む発現物の他にも、同改変アミノ酸配列の
C末端にヒスチジン6残基を結合させた組換え蛋白質及
び同改変アミノ酸配列のN末端にマルトース結合蛋白質
を融合させた融合型組換え蛋白質も、当然に包含される。
これらは上記特に好ましい発現物と同様の機能を有する
15 同効物である。

該蛋白製剤として有用な組換え蛋白質には、その医薬
的に許容される塩も包含される。かかる塩には、当業界
で周知の方法により調製される、例えばナトリウム、カリ
ウム、リチウム、カルシウム、マグネシウム、バリウ
20 ム、アンモニウムなどの無毒性アルカリ金属塩、アルカ
リ土類金属塩及びアンモニウム塩が包含される。更に上
記塩には、本発明有効成分ペプチドと適当な有機酸乃至

無機酸との反応による無毒性酸付加塩も包含される。代表的酸付加塩としては、例えば塩酸塩、塩化水素酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、酢酸塩、蔥酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、ラウリン酸塩、硼酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩(トシレート)、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、スルホン酸塩、グリコール酸塩、マレイン酸塩、アスコルビン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩及びナプシレートなどを例示できる。

10 本発明治療剤は、より詳しくは、上記発現物の薬学的有効量を適当な製剤担体(乃至は希釈剤)と共に含む医薬組成物乃至医薬製剤に調製される。

上記医薬組成物(医薬製剤)に利用できる担体としては、製剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、增量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤などの希釈剤或は賦形剤などを例示でき、これらは得られる製剤の投与単位形態に応じて適宜選択使用される。該製剤形態としては各種のものが治療目的に応じて選択でき、その代表的なものとしては錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、カプセル剤、坐剤、注射剤(液剤、懸濁剤など)、軟膏剤、点眼剤などを例示できる。

特に好ましい本発明医薬製剤は、通常の蛋白製剤など

に使用され得る各種の成分、例えば安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、pH調整剤、界面活性剤などを適宜使用して調製される。

上記安定化剤としては、例えばヒト血清アルブミンや
5 通常のL-アミノ酸、糖類、セルロース誘導体などを例示でき、之等は単独で又は界面活性剤などと組合せて使用できる。特にこの組合せによれば、有効成分の安定性をより向上させ得る場合がある。

上記L-アミノ酸としては、特に限定はなく例えばグ
10 リシン、システィン、グルタミン酸などのいずれでもよい。

上記糖としても特に限定はなく、例えばグルコース、マンノース、ガラクトース、果糖などの单糖類、マンニトール、イノシトール、キシリトールなどの糖アルコール、ショ糖、マルトース、乳糖などの二糖類、デキストラン、ヒドロキシプロピルスター、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸などの多糖類など及びそれらの誘導体などを使用できる。

界面活性剤としても特に限定はなく、イオン性及び非
20 イオン性界面活性剤のいずれも使用でき、例えばポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル系、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ソルビタンモ

ノアシルエステル系、脂肪酸グリセリド系などを使用できる。

セルロース誘導体としても特に限定はなく、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどを使用できる。

上記糖類の添加量は、有効成分 $1 \mu g$ 当り約 0. 0001 mg 程度以上、好ましくは約 0. 01 ~ 10 mg 程度の範囲とするのが適当である。界面活性剤の添加量は、有効成分 $1 \mu g$ 当り約 0. 00001 mg 程度以上、好ましくは約 0. 0001 ~ 0. 01 mg 程度の範囲とするのが適当である。ヒト血清アルブミンの添加量は、有効成分 $1 \mu g$ 当り約 0. 0001 mg 程度以上、好ましくは約 0. 001 ~ 0. 1 mg 程度の範囲とするのが適当である。アミノ酸は、有効成分 $1 \mu g$ 当り約 0. 001 ~ 10 mg 程度とするのが適当である。また、セルロース誘導体の添加量は、有効成分 $1 \mu g$ 当り約 0. 00001 mg 程度以上、好ましくは約 0. 001 ~ 0. 1 mg 程度の範囲とするのが適当である。

本発明医薬製剤中に含まれる有効成分の量は、広範囲

から適宜選択されるが、通常約0.00001～70重量%、好ましくは0.0001～5重量%程度の範囲とするのが適当である。

また本発明医薬製剤中には、各種添加剤、例えば緩衝剤、等張化剤、キレート剤などをも添加することができる。ここで緩衝剤としては、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、 ϵ -アミノカプロン酸、グルタミン酸及び／又はそれらに対応する塩（例えばそれらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩）などを例示できる。等張化剤としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリンなどを例示できる。またキレート剤としては、例えばエデト酸ナトリウム、クエン酸などを例示できる。

本発明医薬製剤は、溶液製剤として使用できる他に、これを凍結乾燥化し保存し得る状態にした後、用時水、生埋的食塩水などを含む緩衝液などで溶解して適当な濃度に調製して使用することも可能である。

また、本発明医薬製剤は、錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、顆粒剤、カプセル剤などの固体投与形態や、溶液、懸濁剤、乳剤、シロップ、エリキシルなどの液剤投与形態に調製されてもよい。これらは更に投与経路に応じて経口

剤、非経口剤、経鼻剤、経膣剤、坐剤、舌下剤、軟膏剤などに分類され、それぞれ通常の方法に従い、調合、成形乃至調製することができる。

例えば、錠剤の形態に成形するに際しては、上記製剤
5 担体として乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸、リン酸カリウムなどの賦形剤、水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、
10 ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどの結合剤、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウムなどの崩壊剤、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリドなどの界面活性剤、白糖、ステアリン、カカオバター、水素添加油などの崩壊抑制剤、第4級アンモニウム塩基、
15 ラウリル硫酸ナトリウムなどの吸収促進剤、グリセリン、デンプンなどの保湿剤、デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸などの吸着剤、精製タル

ク、ステアリン酸塩、ホウ酸末、ポリエチレングリコールなどの滑沢剤などを使用できる。

更に錠剤は必要に応じ通常の剤皮を施した錠剤、例えば糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被錠、フィルムコーティング錠或は二重錠乃至多層錠とすることができる。
5

丸剤の形態に成形するに際しては、製剤担体として例えばブドウ糖、乳糖、デンプン、カカオ脂、硬化植物油、カオリン、タルクなどの賦形剤、アラビアゴム末、トランガント末、ゼラチン、エタノールなどの結合剤、ラミナラン、カンテンなどの崩壊剤などを使用できる。
10

カプセル剤は、常法に従い通常本発明の有効成分を上記で例示した各種の製剤担体と混合して硬質ゼラチンカプセル、軟質カプセルなどに充填して調整される。

経口投与用液体投与形態は、慣用される不活性希釀剤、
15 例えば水、を含む医薬的に許容される溶液、エマルジョン、懸濁液、シロップ、エリキシルなどを包含し、更に湿潤剤、乳剤、懸濁剤などの助剤を含ませることができ、これらは常法に従い調製される。

非経口投与用の液体投与投与形態、例えば滅菌水性乃至非水性溶液、エマルジョン、懸濁液などへの調製に際しては、希釀剤として例えば水、エチルアルコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、エトキ

シ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル及びオリーブ油などの植物油などを使用でき、また注入可能な有機エステル類、例えばオレイン酸エチルなどを配合できる。これらには更に通常の溶解補助剤、緩衝剤、湿润剤、乳化剤、懸濁剤、保存剤、分散剤などを添加することもできる。滅菌は、例えばバクテリア保留フィルターを通過させる濾過操作、殺菌剤の配合、照射処理及び加熱処理などにより実施できる。また、これらは使用直前に滅菌水や適当な滅菌可能媒体に溶解することのできる滅菌固体組成物形態に調製することもできる。

坐剤や膣投与用製剤の形態に成形するに際しては、製剤担体として、例えばポリエチレングリコール、カカオ脂、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、ゼラチン及び半合成グリセライドなどを使用できる。

ペースト、クリーム、ゲルなどの軟膏剤の形態に成形するに際しては、希釈剤として、例えば白色ワセリン、パラフイン、グリセリン、セルロース誘導体、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト及びオリーブ油などの植物油などを使用できる。

経鼻又は舌下投与用組成物は、周知の標準賦形剤を用いて、常法に従い調製することができる。

尚、本発明医薬製剤中には、必要に応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤などや他の医薬品などを含
5 有させることもできる。

上記医薬製剤の投与方法は、特に制限がなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度などに応じて決定される。例えば錠剤、丸剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤及びカプセル剤は経口投与され、注射
10 剤は単独で又はブドウ糖やアミノ酸などの通常の補液と混合して静脈内投与され、更に必要に応じ単独で筋肉内、皮内、皮下もしくは腹腔内投与され、坐剤は直腸内投与され、経膣剤は膣内投与され、経鼻剤は鼻腔内投与され、舌下剤は口腔内投与され、軟膏剤は経皮的に局所投与さ
15 れる。

上記医薬製剤の投与量は、特に限定されず、所望の治療効果、投与法、治療期間、患者の年齢、性別その他の条件などに応じて広範囲より適宜選択されるが、一般的には、通常有効成分量が、1日成人体重1kg当たり、約
20 0.01μg～10mg程度、好ましくは約0.1μg～1mg程度とするのがよく、該製剤は1日に1回又は数回に分けて投与することができる。

図面の簡単な説明

図1乃至図3は、本発明蛋白質の神経細胞に対する生存維持効果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

5 以下、本発明を更に詳しく説明するため、実施例を挙げる。

実施例1 TMP-2遺伝子

(1) TMP-2遺伝子のクローニング及びDNAシークエンシング

10 ヒト胎児脳より抽出したmRNAをクローンテック社より購入し、出発材料とした。

上記各mRNAよりcDNAを合成し、ベクターλZAP II（ストラタジーン社製）に挿入し、cDNAライプラリーを構築した（大塚GENリサーチ・インスティチュート、大塚製薬株式会社）。

インビボ・エキシジョン法 (in vivo excision : Short, J. M., et al., Nucleic Acids Res., 16, 7583-7600 (1988)) によって、寒天培地上にヒト遺伝子を含む大腸菌コロニーを形成させ、ランダムにそのコロニーをピックアップし、96ウェルマイクロプレートにヒト遺伝子を含む大腸菌クローンを登録した。登録されたクローンは、-80°Cにて保存した。

次に登録した各クローンを 1. 5 ml の LB 培地で一昼夜培養し、プラスミド自動抽出装置 P I - 1 0 0 (クラボウ社製) を用いて DNA を抽出精製した。尚、コンタミした大腸菌の RNA は、RNase 处理により分解除去した。最終的に 3 0 μ l に溶解し、2 μ l は、ミニゲルによりおおまかに DNA のサイズ、量をチェックし、7 μ l をシークエンス反応用に用い、残りの 2 1 μ l は、プラスミド DNA として 4 °C に保存した。

続いて、T 3、T 7 或は合成オリゴヌクレオチド・プライマーを用いるサンガーらのジデオキシターミネーター法 (Sanger, F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 74, 5463-5467 (1977)) 或はジデオキシターミネーター法に PCR 法を加味した方法であるサイクルシークエンス法 (Carothers, A. M., et al., Bio. Techniques, 7, 494-499 (1989)) を実施した。これらは、少量のプラスミド DNA (およそ 0. 1 - 0. 5 μ g) をテンプレート (鋳型) として 4 種の塩基特異的に停止する伸長反応させる方法である。

シークエンスプライマーとしては、FITC 20 (fluorescein isothiocyanate) の蛍光標識したものを使用し、Taq ポリメラーゼにより通常約 25 サイクル反応させた。その PCR 産物はポリアクリルアミド・尿素

ゲルで分離し、蛍光標識したDNA断片を自動DNAシークエンサー、ALF™DNAシークエンサー（ファルマシア社製）によりcDNAの5'末端側から約400塩基の配列を決定した。

5 また、3'非翻訳領域は各遺伝子のヘテロジエナイティ(heterogeneity)が高く、個々の遺伝子を区別するには適しているので、場合によっては、3'側のシークエンスも行った。

DNAシークエンサーで得られた膨大な塩基配列情報
10 は、64ビットのコンピューターDEC3400に転送
し、コンピューターによるホモロジー解析に用いた。ホ
モロジー解析には、UWGC GのFASTAプログラム
(Pearson, W. R. and Lipman, D. J., Proc. Natl. Acad.
Sci., USA., 85, 2444-2448(1988))によるデーターベー
15 ス(GenBank, EMBL)検索により行った。

上記方法によって、ヒト胎児脳cDNAライブラリー
から任意に選択したcDNAクローンの配列解析とデータ・ベースの検索を行った結果、膜蛋白質遺伝子
(transmembrane protein: アクセッションNo.; U19878)に
20 相同性の高いcDNA配列を有するクローン(GEN-
092E10)を見出した。

しかして従来、膜蛋白質遺伝子は、カエル(Xenopus

laevis)とヒトにおいてクローニングされており、これらはフォリスタチン・モジュル(follistatin module)とEGF領域(epidermal growth factor domain)を有する細胞膜貫通型のタンパク質の遺伝子であると考えられる
5 (アクセッションNo. ; U19878)。

上記蛋白質遺伝子の配列情報から、GEN-092E
10 クローンは5'領域を欠いていたので、λgt10
cDNAライブラリー(Human Fetal Brain 5'-STRETCH
PLUS cDNA; クローンテック社製)を、GEN-092E
10 クローンをプローブとしてスクリーニングすること
により、さらに5'上流を含むcDNAクローンを単離
した。

このcDNAクローンの両ストランドを配列決定することによって、全体のコード領域をカバーしている配列
15 が明らかになり、この遺伝子をTMP-2遺伝子と命名
した。

TMP-2遺伝子は配列番号：2で示される1122
塩基のオープン・リーディング・フレームを含んでいて、
これによってコードされるアミノ酸は、配列番号：1で
20 示されるように374アミノ酸残基を有し、TMP-2
の全cDNAクローンの核酸配列は、配列番号：3で示
されるとおり、1721塩基からなっていた。

配列番号：3で示されるように5'非コード領域は、総体的にG Cリッチであった。開始コドンの候補配列は、いくつか存在したが、スキャンニング・モデルに従えば、cDNAクローンの5番目のATG（塩基配列番号5 368-370番目）が開始コドンと推定された。停止コドンは、塩基配列番号1490-1492番目に位置していた。ポリ・アデニレーション・シグナル(AATAAA)は、塩基配列番号1703-1708番目位置していた。TMP-2遺伝子産物の計算された分子量は、10 41, 400ダルトンであった。

上記したように膜蛋白質遺伝子は、フォリスタチン・モジュルとEGF領域を有しているが、本例で得られたヒト遺伝子においても、これらのモチーフが保存されていた。

15 また、TMP-2遺伝子はTGF- α (transforming growth factor- α ; Deryck, R., et al., Cell, 38, 287-297 (1984))、 β -セルリン(β -cellulin; Igarashi, K. and Folkman, J., Science, 259, 1604-1607 (1993))、ヘパリン結合EGF様成長因子(heparin-binding EGF-like growth factor; Higashiyama, S., et al., Science, 251, 936-939 (1991))及びシュワノマ誘導成長因子(Schwannoma-derived growth factor; Kimura, H.,

et al., *Nature*, 348, 257-260 (1990))と、EGF領域周辺においてアミノ酸レベルで相同意を有することなどから、細胞の増殖や細胞間のコミュニケーションに重要な役割を果たすと考えられる。

5 (2) ノーザンプロット分析

正常ヒト組織における TMP-2 蛋白質の mRNA の発現をランダム・オリゴヌクレオチド・プライミング法によって標識したヒト cDNA クローンをプローブとするノーザンプロットにより評価した。

10 ノーザンプロット分析は、製品使用法に従い、ヒト M T N プロット (Human Multiple Tissue Northern blot; クローンテック社製、パロ・アルト、カリフォルニア、米国) を用いて実施した。

即ち、上記 G E N - 0 9 2 E 1 0 クローンの P C R 増幅産物を [³²P] - d C T P (ランダムプライムド D N A ラベリングキット、ペーリングガーマンハイム社) により標識してプローブとした。

プロッティングは、42℃で一晩、50% ホルムアミド / 5 × S S C / 50 × デンハルツ溶液 / 0.1% 20 S D S 溶液 (100 μg / ml 変性サケ精子 D N A 含有) の溶液中でハイブリダイズした。2 × S S C / 0.01% S D S にて室温下にて 2 回洗浄後、次いで 0.1 ×

S S C / 0. 0 5 % S D S にて 5 0 ℃ 下に 4 0 分間で 3 回洗浄した。フィルターは - 7 0 ℃ 下に 1 8 時間、 X 線 フィルム（コダック社製）に対して露光した。

その結果、脳と前立腺において、 T M P - 2 m R N A
5 の高い発現が検出された。該 T M P - 2 遺伝子の
m R N A のサイズは、約 2 k b であった。

実施例 2 T M P - 2 蛋白質

(1) M B P - T M P - 2 融合蛋白質発現ベクターの構築

10 実施例 1 で得られた T M P - 2 遺伝子のコード領域から、膜貫通領域として予測される部分を除いた領域（配列番号：1 に示されるアミノ酸配列中、3 4 - 3 1 8 アミノ酸残基部分）をコードする遺伝子をサブクローニングするために、配列番号：3 に示される D N A 配列情報を基に、配列番号：4 及び：5 に示す配列のプライマー A 及び B を作成した。

尚、プライマー A は EcoRI サイトを、プライマー B は SalI サイトを含んでいる。両プライマーを利用し、ヒト胎児脳 m R N A から誘導された c D N A を用いて P C R
20 を行い、およそ 9 0 0 塩基の産物を得た。增幅させた c D N A を C H R O M A S P I N - 4 0 0 カラム（クローンテック社製）で精製した後、 p M A L - C 2 (New

England Biolabs 社製) に挿入し、大腸菌 T B 1 にトランスクローニングし、全配列を確認した。得られた融合ベクターは、目的の TMP-2 遺伝子産物とそのアミノ末端側にマルトース結合蛋白質 (MBP) 5 を融合させた融合蛋白質を発現するベクターである。

(2) 融合蛋白質の発現と精製

上記により調製したベクターを大腸菌 (T B 1) にトランスクローニングし、得られた融合ベクターを含む大腸菌をアンピシリンを含む LB 培地で 30 °C で 1 晩培養後、10 同培地で 10 倍に希釈し、37 °C で 2 時間培養し、これに 2 mM になるように IPTG を添加して、更に 20 °C で 1 晩培養した。遠心により菌を回収し、10% ショ糖を含む TED (20 mM トリス塩酸 (pH7.5)、1 mM EDTA、1 mM DTT) に懸濁させ、プロテアーゼイ 15 ンヒビターカクテル (Sigma 社) を加えて超音波破碎した後、超遠心して上清を得た。この上清をアミロース樹脂にアプライし、1% CHAPS 及び 0.1 M NaCl を含む TED、続いて 0.1 M NaCl を含む TED でカラムを十分に洗浄した後、10 mM マルトースを含んだ 20 TED で目的融合蛋白質 (MBP-TMP-2) を溶出した。

最終的な溶出画分及び各精製ステップの画分は SDS

-PAGEにて精製度と定量を行った。溶出画分は、必要に応じて、SMARTシステムのMonoQ PC1.6／5カラム(Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いて更に精製した。即ち、TEDで平衡化したMonoQ
5 PC1.6／5カラムに上記溶出画分を吸着させ、0～0.5M NaClの直線濃度勾配で溶出を行った。目的融合蛋白質を含む画分の確認は、SDS-PAGEで行った。

コントロール用のMBPは、pMAL-C2ベクターを
10 トランスフォームした大腸菌(TB1)から、上記MBP-TMP-2融合蛋白質の場合と同様にして、アミロース樹脂により精製した。

(3) TMP-2-His発現ベクターの構築

実施例1で得られたTMP-2遺伝子のコード領域から、膜貫通領域として予測される部分を除いた領域(配列番号：1に示されるアミノ酸配列中、34-318アミノ酸残基部分)をコードする遺伝子をサブクローニングするために、配列番号：3に示されるDNA配列情報を基に、配列番号：6及び：7に示す配列のプライマー
20 C及びDを作成した。

尚、プライマーCはNdeIサイトを、プライマーDはXhoIサイトを含んでいる。両プライマーを利用し、

ヒト胎児脳mRNAから誘導されたcDNAを用いてPCRを行い、およそ900塩基の産物を得た。得られた増幅cDNA断片をNdeI及びXhoIで切断後、pET21b-lacI^a(Invitrogen社製pET21b
5にlacI^aを導入して改変したもの)の同酵素処理物に挿入して発現ベクターを精製した。

上記pET21b-lacI^aは、以下のようにして作成した。即ち、pET21b(Invitrogen社製)及びpBluecriptIIをそれぞれXbaI及び
10ApaIで切断処理し、得られたpET21bの約1kb断片を、切断したpBluecriptIIにサブクローニングした。得られたクローンより更にSphI及びKpnIにて約750bpの断片を切り出し、pKFB19kを同酵素で処理したものにサブクローニングした。次に、5'端をリン酸化した配列番号：12に
15示す配列の合成プライマーを用いて、Mutant-Super Express Km(タカラ社製)によつてlacI^a(lacリプレッサーの過剰発現突然変異体、Michele P. Calos, Nature, 274, 762-765, (1978))を導
20入した後、SphI及びMluIで切り出し、pET21bをSphI及びMluIで切断したものにサブクローニングしてシークエンスを確認した。

上記で得られた発現ベクターは、目的のT M P - 2 蛋白質の 3 4 - 3 1 8 アミノ酸残基部分とそのカルボキシル末端（C 末端）にヒスチジン・タグ（ヒスチジン 6 残基）を融合させた融合蛋白質を発現し得るベクターである。
5

上記で得た発現ベクターを、 p L y s E プラスミドを導入した大腸菌 B L 2 1 (D E 3) にトランスフォームし、得られた大腸菌を L B 培地に懸濁させた後、 1 時間 3 7 °C で培養し、最終濃度 2 m M の I P T G を加えて、
10 2 0 °C で 1 晩蛋白質の誘導を行った。

得られた培養液から 1 m l を分取して、菌体を回収し、 S D S サンプル・バッファー (62. 5 mM トリス塩酸 (pH 6. 8), 2% SDS, 5% 2-メルカプトエタノール, 7% グリセリン) に懸濁させた後、 1 0 0 °C で加熱し 1 3 % S D S - P A G E を行った後、クマシー染色及び抗 M B P - 0 9 2 抗体によるウエスタンブロッティングを行って、目的蛋白質の発現を調べた。
15

その結果、目的蛋白質の発現は確認できたが、発現量が非常に少ないことが判った。これは目的蛋白質をコードしている N 末端側の D N A 配列に大腸菌では翻訳されにくい（頻度の低い）コドンが多数存在しているためであると予想された。
20

そこで、上記N末端側のDNA配列を大腸菌で翻訳されやすいものとするために、配列番号：8及び：9に示すリンカーDNAのE及びFを用いて高発現ベクターの作成を行った。

5 尚、上記リンカー配列内のアミノ酸配列は、マウス及びヒトにおいて同じであり、これらのDNAをアニーリングしてリンカーを作成した。その5'末端はNdeIで切斷したときに生じるサイトを、また3'末端はCfr10Iで切斷したときに生じるサイトを持っている
10 る。

このリンカーを用いて、クローニングしたそれぞれのTMP-2のNdeI-Cfr10Iの断片と交換を試みた。しかしながらこの方法ではリンカーがうまく導入されないために、次いで、リンカーE及びpET21の
15 シーケンスプライマーであるP-T10（配列番号：10に示す配列を有する）を用いてPCR後、更にこれを鑄型として、プライマーG（配列番号：11に示す配列を有する）及び上記P-T10を用いて再度PCRを行った。

20 尚プライマーGにはNdeI認識配列が含まれている。得られたPCR産物をNdeI及びXbaIで消化して、pET21b-1acI^aの同サイトにクローニング

したプラスミドを調製して、そのDNA配列を確認した結果、このものはリンカーEの全配列を含むことが確認されたので、このベクターを用いて目的蛋白質の発現誘導を同様にして実施した。

- 5 その結果、再構築前の発現ベクターを用いた場合に比べて、有意に目的蛋白質の発現量が向上していることを確認した。

(4) 本発明有効成分蛋白質の発現と精製

- 上記(3)で再構築した発現ベクターを、pLysE
10 プラスミドを含む大腸菌BL21(DE3)株に導入し、得られた形質転換体をアンピシリンを含む液体LB培地で回収し、その一部をアンピシリンを含む液体LB培地に植菌した。

- 37°Cで対数増殖期まで培養後、最終濃度2mMになるようにIPTGを添加して、20°Cで1晩培養した。得られた培養液から大腸菌を回収し、10%ショ糖を含むTED(10% sucrose含有Tris-HCl-EDTA-DTT)に懸濁させ、超音波破碎した後、100000×gで超遠心して上清と沈殿とを分離した。

- 20 沈殿を10%ショ糖を含むTEDに懸濁させ、同様にして破碎、分画を合計5回繰り返し、得られた沈殿を1%CHAPS及び10%ショ糖を含むTEDに懸濁させ、

超音波破碎後、 $100000 \times g$ にて上清と沈殿とに分画した。

得られた上清を T E D で希釈し、N i - N T A スーパーフローカラム (Q I A g e n 社製) にて展開して、目的蛋白質を含む画分を集め、M o n o Q カラム (Amersham Pharmacia Biotech社製) にて展開し、目的蛋白質を含む画分を集め、セントリコン - 10 (Centricon-10, Amicon社製) にて濃縮した。

(5) TMP-2 発現ベクターの構築
10 TMP-2 の 34-318 アミノ酸残基部分をコードする遺伝子をサブクローニングするために、プライマー G 及びプライマー B を利用し、上記 (3) で構築した高発現ベクターを鋳型として、P C R を行った。

得られた P C R 産物を N d e I 及び S a l I で消化し、
15 p E T 2 1 a - 1 a c l [°] の同サイトにクローニングしたプラスミドを調製し、全塩基配列を確認した。このベクターによって得られる組換え蛋白質は、TMP-2 の 34-318 アミノ酸残基部分の他にはいかなるタグも含んでいない。

20 (6) 発現と精製

上記 (5) で得られたベクターを用い、目的蛋白質を上記 (4) と同様にして発現させた。得られた大腸菌を

10 % ショ糖を含む T E D に懸濁させ、プロテアーゼイ
ンヒビター カクテルを加えて超音波破碎した後、超遠心
して上清と沈殿とを得た。得られた沈殿につき、同懸濁、
超遠心を繰り返した。3回目と4回目の上清に、25 %
5 鮑和になるように T E D に溶かした鮑和硫安溶液を加え、
4 °C で一晩静置後、遠心して沈殿を得た。該沈殿をプロ
テアーゼインヒビター カクテルを含む T E D に懸濁させ、
同緩衝液に対して透析を行った。透析中に生じた沈殿を
遠心により除き、上清より目的蛋白質を次の操作により
10 精製した。

即ち、上記上清を T E D で平衡化した Q - セファロ
ス F F カラムにアプライし、N a C l を含む T E D によ
り溶出を行った。N a C l を終濃度 2 M になるように添
加し、オクチル - セルロファイン (Octyl-cellulofine,
15 生化学工業社製) にアプライした。

目的の T M P - 2 組換え蛋白質は、主として非吸着画
分に回収された。この画分に硫安を加えて 50 % 鮑和硫
安溶液とし、T M P - 2 を沈殿させた。この沈殿を
T E D に懸濁、脱塩した後、M i n i - Q カラム
20 (Amersham Pharmacia Biotech社製) を用いて更に精製
した。溶出は、0 ~ 0.3 M の N a C l の直線濃度勾配
の後、0.3 M N a C l でしばらく洗浄を続け、更に

0.3～0.5MのNaClの直線濃度勾配によって行つた。

かくしてTMP-2を、0.3～0.5M NaCl画分に純度よく回収した。この画分を最終精製画分とした。
5 濃度はSDS-PAGE上で、ウシ血清アルブミンを内部標準として決定した。精製したTMP-2は、液体窒素で凍結後、-80°Cで保存した。

(7) 脳神経細胞の単離と培養

SD系ラット15日齢胎仔より無菌的に全脳を取り出し、中脳腹側部(ventral midbrain)を切り分けた。メスで細切後、0.25%トリプシン、0.002%DNAseを含むリン酸塩緩衝生理食塩液(PBS)中で37°C、20分間インキュベートして酵素処理した。牛胎児血清を添加し酵素反応を停止させた後、プラスチック製チップを付けたピペットで細胞液を吸い上げて吐き出す操作を3回繰返して細胞を分散させた。レンズペーパーを2枚重ねたフィルターに細胞液をろ過して消化されなかつた組織片を除き、1000 rpmで5分間遠心した。D MEM/F12培地(ギブコ社製)を用いて細胞を洗い、10%牛胎児血清を含むD MEM/F12培地を入れたポリL-リジンでコーティングした96ウェルプレートに細胞を最終的に 3.1×10^5 細胞/cm²

になるように播いた。

(8) 本発明有効成分蛋白質による処理

上記細胞を 24 時間培養後、培養液を 1% N2 添加物 (N2 Supplement, GIBCO社製) を含んだ D M E M / F 1 2 5 に交換し、上記 (2) 及び (4) のそれぞれで調製した本発明有効成分蛋白質を 20、200 及び 400 ng / m l の各濃度で添加した (本発明群)。

また、比較のため、M B P (400 ng / m l) 添加 (M B P 群) 及び沸騰水浴中で 5 分間加熱処理した融合 10 蛋白質 (400 ng / m l) 添加 (沸騰融合蛋白質群) を行った。

(9) チロシン水酸化酵素免疫組織化学

上記 (8) で調製した各群の細胞 (培養液) を 72 時間培養後、P B S に溶解した 4% パラホルムアルデヒド 15 を用いて 15 分間室温で放置して細胞を固定し、その後 1% トリトン X 100 / P B S を用いて膜を透過性にした。

抗体の非特異的な結合を防ぐために、細胞を 10% ヤギ血清を含む P B S で 1 時間インキュベートし、その後、 20 抗チロシン水酸化酵素ポリクロナール抗体 (CHEMICON社製、P B S で 1000 倍希釈) を用いて 16 時間 4°C で細胞をインキュベートした。抗体液を除いた後、細胞を

PBSで洗い、ペルオキシダーゼ標識デキストランポリマー結合ヤギ抗ラビットイムノグロブリン（DAKO社製）を加えて室温で1時間インキュベートした。

チロシン水酸化酵素陽性細胞の検出は、基質としてジ
5 アミノベンチジンを用いる発色反応の有無によった。チ
ロシン水酸化酵素陽性細胞数を指標として、ドパミン神
経細胞の生存維持を評価した。

（10）チロシン水酸化酵素陽性細胞数の計測

1 ウェルあたりランダムにウェル面積の10%に相当
10 するフィールド内のチロシン水酸化酵素陽性細胞数を、
11 フィールドについて計測（倍率×100）し、測定
値を cm^2 あたりの細胞数に換算した。

（11）初代培養ラット中脳ドパミン神経細胞の生存維
持に対する本発明有効成分蛋白質の効果
15 結果を図1及び図2（縦軸：チロシン水酸化酵素陽性
細胞数（細胞/ cm^2 ）、横軸：各群）に示す。

図1において、各群は次の通りであり、nはウェル数
を示す。

対照群…何等の添加物も添加しなかったコントロール群
20 （n=8）

MBP群…MBP 400 ng/m1 添加群（n=8）

沸騰融合蛋白質群…沸騰水浴中で5分間加熱処理したM

B P - T M P - 2 融合蛋白質 4 0 0 n g / m l を添加した群 (n = 8)

本発明群 … M B P - T M P - 2 融合蛋白質 4 0 0 n g / m l を添加した群 (n = 8)

5 また図中、 *印は対照群に対して有意差なしを、 **は対照群に対して有意差あり ($p < 0.05$, Dunnett's testによる)をそれぞれ示す。

図 1 より、 M B P - T M P - 2 融合蛋白質添加の本発明群では、該融合蛋白質に依存してドバミン神経細胞の
10 生存促進（細胞死の抑制）がなされることが明らかである。この効果は、対照群に対して、 $p < 0.05$ (Dunnett's testによる)の有意差を示した。

尚、 M B P 群では、対照群と有意差は認められなかつた。また、沸騰融合蛋白質群では、ドバミン神経細胞に
15 対する生存維持効果は消失した。

また、図 2において、各群は次の通りであり、 n はウエル数を示す。

対照群 … 何等の添加物も添加しなかったコントロール群 (n = 6)

20 本発明群 … T M P - 2 - H i s 融合蛋白質のそれぞれ 0.1、 1 及び 1 0 n g / m l を添加した群 (n = 6)

また図中、 *印は対照群に対して有意差なしを、 **

は対照群に対して有意差あり ($p < 0.05$, Dunnett's testによる)を、 *** は対照群に対して有意差あり ($p < 0.01$, Dunnett's testによる) をそれぞれ示す。

図 2 より、 TMP-2-His 融合蛋白質添加の本発明群では、該融合蛋白質の濃度に依存してドバミン神経細胞の生存が促進されることが明らかである。この効果は、対照群に対して、融合蛋白質 $1 \text{ ng}/\text{ml}$ で、 $p < 0.05$ (Dunnett's testによる) の有意差を、また融合蛋白質 $10 \text{ ng}/\text{ml}$ で、 $p < 0.01$ (Dunnett's testによる) の有意差を、それぞれ示した。

以上のことから、MBP-TMP-2 融合蛋白質及び TMP-2-His 融合蛋白質は、いずれも有意な神経細胞生存促進効果を奏し得るものであり、この効果が TMP-2 蛋白質に基づくことが明らかである。

更に、上記図 2 に結果を示す試験において、前記(4)で調製した本発明有効成分蛋白質 (TMP-2-His) に代えて、前記(6)で調製した本発明有効成分蛋白質 (TMP-2 の 34-318 アミノ酸配列からなる部分蛋白質、表中「TMP-2」と表示) を 0.01 、 0.1 及び $1 \text{ ng}/\text{ml}$ の各濃度で添加する以外は同一試験を繰り返した。得られた結果を、図 2 と同様にして図 3 に示す。

図3中、*印は対照群に対して有意差なしを、**は対照群に対して有意差あり($p < 0.05$, Dunnett's testによる)を、***は対照群に対して有意差あり($p < 0.01$, Dunnett's testによる)をそれぞれ示す。

5 図3からも、TMP-2の特定部分蛋白質添加の本発明群では、該蛋白質の濃度に依存してチロシン水酸化酵素陽性細胞の生存が促進されることが明らかであり、この結果より、TMP-2の特定部分が、神経細胞生存促進効果を奏し得ることが明らかである。

10

産業上の利用の可能性

本発明によれば、神経細胞生存促進効果を奏する因子を神経栄養因子と見なして、該神経栄養因子として機能する組換え蛋白質を有効成分とする神経変性疾患治療剤が提供できる。これはパーキンソン病、アルツハイマー病、筋発育不全性側索硬化症、ハンチントン病、脳梗塞、糖尿病性神経症、外傷性神経変性疾患などの神経変性疾患の治療に有効である。

15
20

請 求 の 範 囲

1. (a) 配列番号：1で示されるアミノ酸配列の蛋白質の34-318アミノ酸配列部分を含む発現物及び
(b) 配列番号：1で示されるアミノ酸配列の蛋白質の34-318アミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列部分を含む発現物から選ばれる少なくとも1種の有効成分の有効量を、製剤担体と共に含有することを特徴とする神経変性疾患治療剤。
10 2. 有効成分が配列番号：1で示されるアミノ酸配列の蛋白質の34-318アミノ酸配列の発現物である請求項1に記載の神経変性疾患治療剤。
3. 有効成分が配列番号：1で示されるアミノ酸配列の蛋白質の34-318アミノ酸配列のC末端にヒスチジン6残基を結合させたものである請求項1に記載の神経変性疾患治療剤。
15 4. 有効成分が配列番号：1で示されるアミノ酸配列の蛋白質の34-318アミノ酸配列のN末端にマルトース結合蛋白質を融合させた融合蛋白質である請求項1に記載の神経変性疾患治療剤。
20 5. パーキンソン病、アルツハイマー病、筋発育不全性側索硬化症、ハンチントン病、脳梗塞、糖尿病性神経

症及び外傷性神経変性疾患の治療に用いられる請求項

1 に記載の神経変性疾患治療剤。

6. (a) 配列番号：1で示されるアミノ酸配列の蛋白質
の34-318アミノ酸配列部分を含む発現物及び

5 (b) 配列番号：1で示されるアミノ酸配列の蛋白質
の34-318アミノ酸配列において1又は複数のア
ミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列部分
を含む発現物から選ばれる少なくとも1種の有効成分
の有効量を、処置を要求される患者に投与することを
10 特徴とする神経変性疾患の治療方法。

7. 有効成分が配列番号：1で示されるアミノ酸配列の
蛋白質の34-318アミノ酸配列の発現物である請
求項6に記載の神経変性疾患の治療方法。

8. 有効成分が配列番号：1で示されるアミノ酸配列の
15 蛋白質の34-318アミノ酸配列のC末端にヒスチ
ジン6残基を結合させたものである請求項6に記載の
神経変性疾患の治療方法。

9. 有効成分が配列番号：1で示されるアミノ酸配列の
蛋白質の34-318アミノ酸配列のN末端にマルト
20 ース結合蛋白質を融合させた融合蛋白質である請求項
6に記載の神経変性疾患の治療方法。

10. パーキンソン病、アルツハイマー病、筋発育不全

性側索硬化症、ハンチントン病、脳梗塞、糖尿病性神経症及び外傷性神経変性疾患の治療に用いられる請求項 6 に記載の神経変性疾患の治療方法。

1 1. (a) 配列番号：1 で示されるアミノ酸配列の蛋白質の 34 - 318 アミノ酸配列部分を含む発現物及び (b) 配列番号：1 で示されるアミノ酸配列の蛋白質の 34 - 318 アミノ酸配列において 1 又は複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列部分を含む発現物から選ばれる少なくとも 1 種の有効成分の、神経変性疾患治療剤の製造のための使用。
5

1 2. 有効成分が配列番号：1 で示されるアミノ酸配列の蛋白質の 34 - 318 アミノ酸配列の発現物である請求項 1 1 に記載の使用。

1 3. 有効成分が配列番号：1 で示されるアミノ酸配列の蛋白質の 34 - 318 アミノ酸配列の C 末端にヒスチジン 6 残基を結合させたものである請求項 1 1 に記載の使用。
15

1 4. 有効成分が配列番号：1 で示されるアミノ酸配列の蛋白質の 34 - 318 アミノ酸配列の N 末端にマルトース結合蛋白質を融合させた融合蛋白質である請求項 1 1 に記載の使用。
20

1 5. パーキンソン病、アルツハイマー病、筋発育不全

性側索硬化症、ハンチントン病、脳梗塞、糖尿病性神
経症及び外傷性神経変性疾患の治療剤の製造のための
請求項 1 1 に記載の発現物の使用。

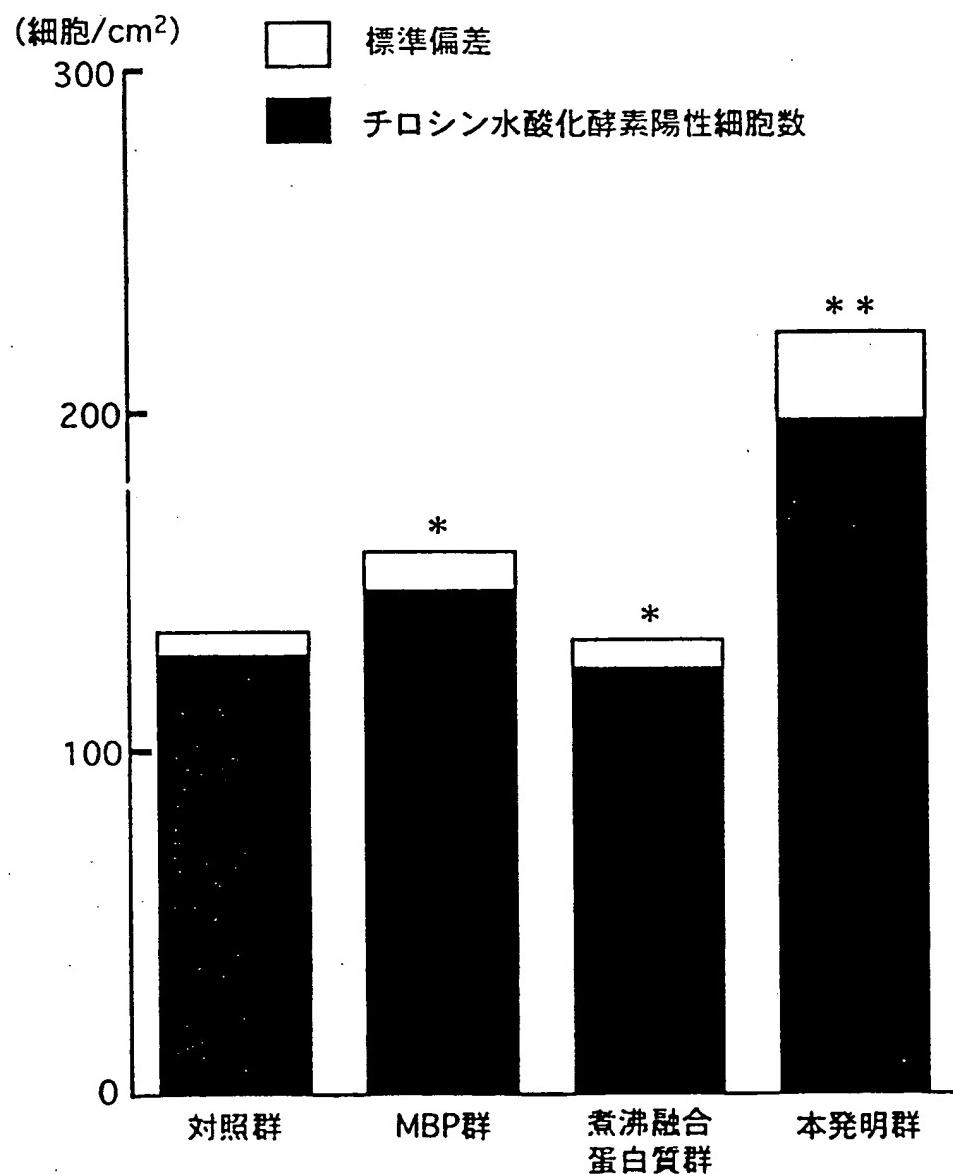
5

10

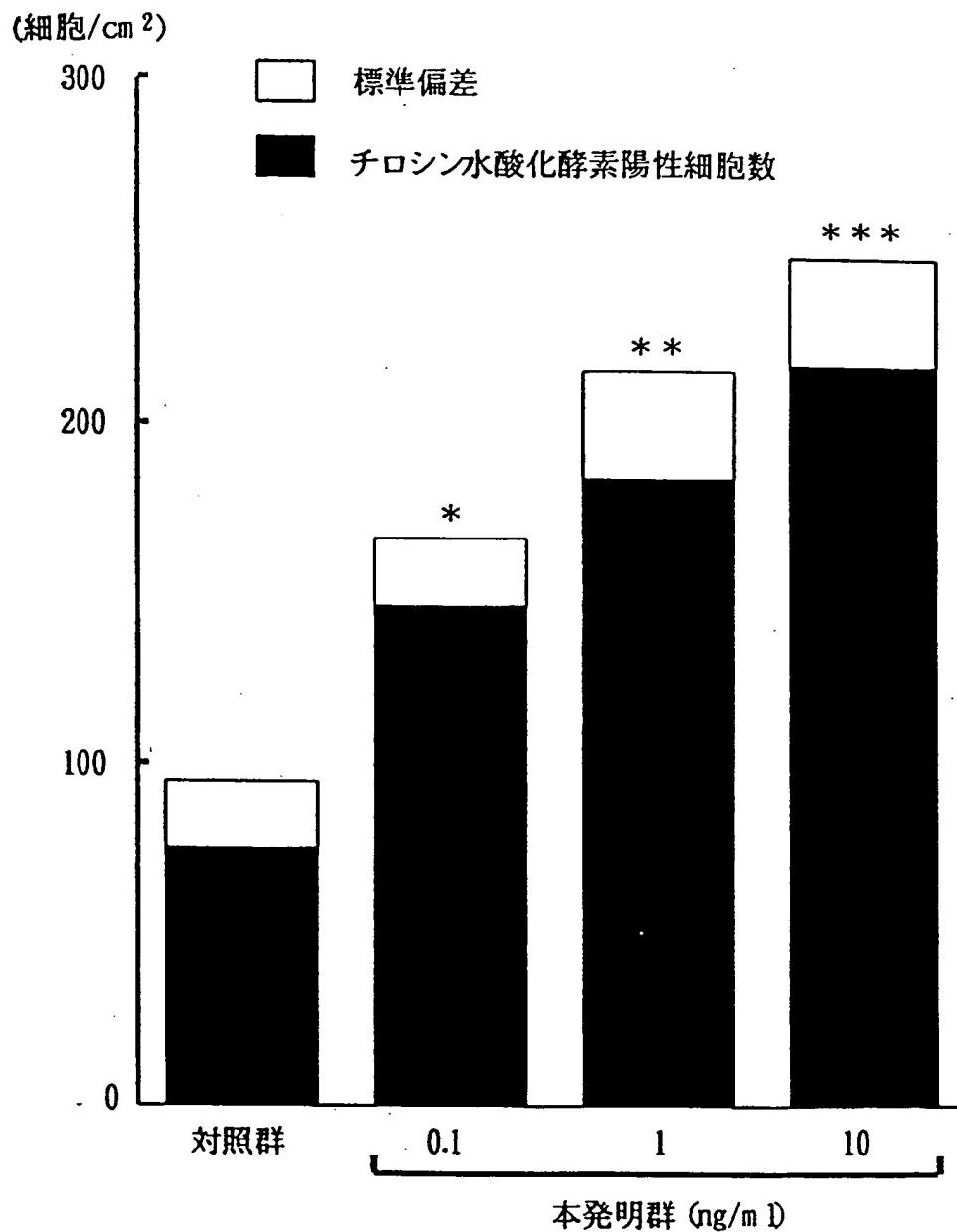
15

20

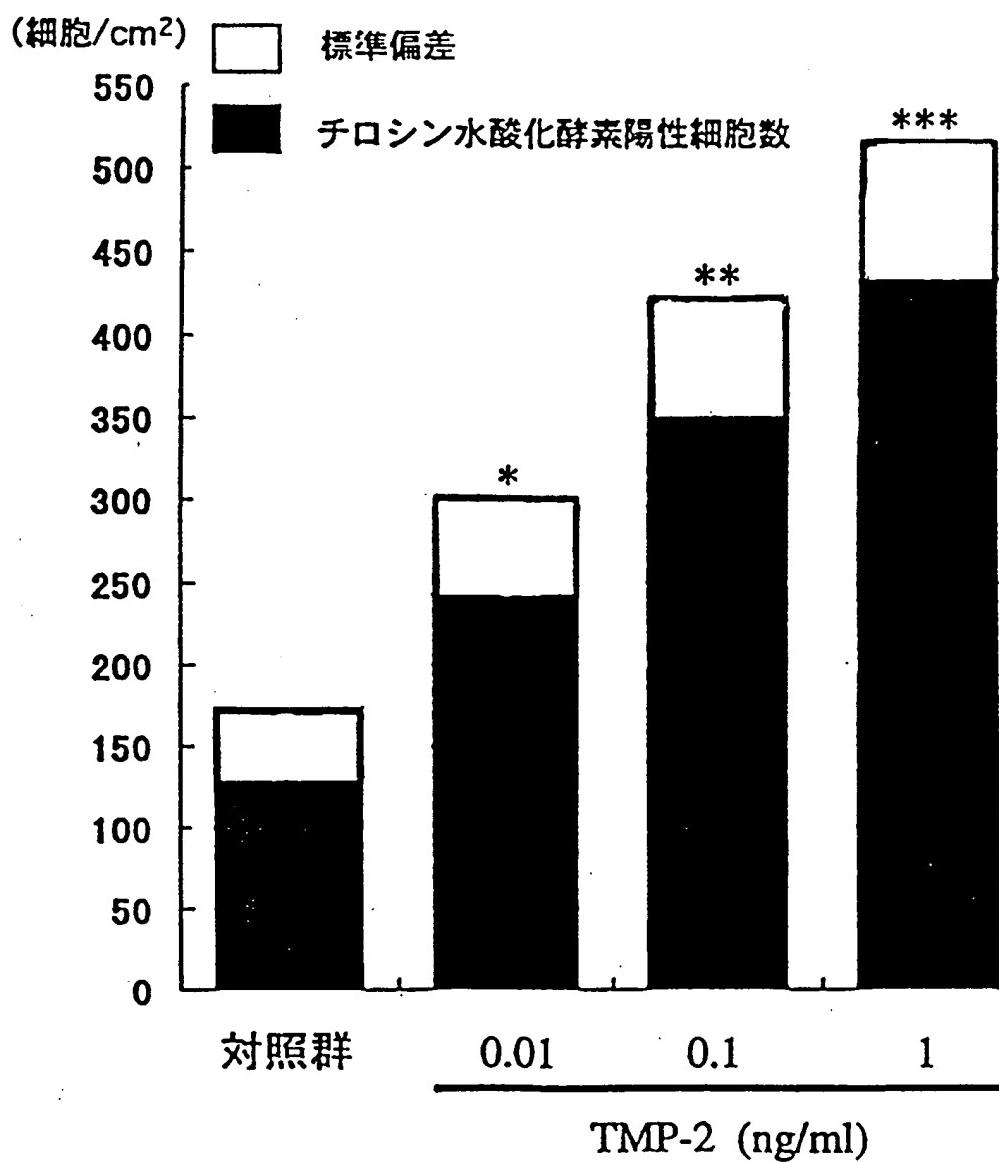
F I G. 1



F I G. 2



F I G. 3



SEQUENCE LISTING

<110> Ostuka Pharmaceutical Co., Ltd.
<120> An agent for neurodegenerative disorders
<130> P99-42
<160> 12
<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 374

<212> PRT

<213> human embryonic brain

<400> 1

Met Val Leu Trp Glu Ser Pro Arg Gln Cys Ser Ser Trp Thr Leu Cys

1 5 10 15

Glu Gly Phe Cys Trp Leu Leu Leu Pro Val Met Leu Leu Ile Val

20 25 30

Ala Arg Pro Val Lys Leu Ala Ala Phe Pro Thr Ser Leu Ser Asp Cys

35 40 45

Gln Thr Pro Thr Gly Trp Asn Cys Ser Gly Tyr Asp Asp Arg Glu Asn

50 55 60

Asp Leu Phe Leu Cys Asp Thr Asn Thr Cys Lys Phe Asp Gly Glu Cys

65 70 75 80

Leu Arg Ile Gly Asp Thr Val Thr Cys Val Cys Gln Phe Lys Cys Asn

85 90 95

Asn Asp Tyr Val Pro Val Cys Gly Ser Asn Gly Glu Ser Tyr Gln Asn

100 105 110

Glu Cys Tyr Leu Arg Gln Ala Ala Cys Lys Gln Gln Ser Glu Ile Leu

115 120 125

Val Val Ser Glu Gly Ser Cys Ala Thr Asp Ala Gly Ser Gly Ser Gly

130	135	140
Asp Gly Val His Glu Gly Ser Gly Glu Thr Ser Gln Lys Glu Thr Ser		
145	150	155
Thr Cys Asp Ile Cys Gln Phe Gly Ala Glu Cys Asp Glu Asp Ala Glu		
165	170	175
Asp Val Trp Cys Val Cys Asn Ile Asp Cys Ser Gln Thr Asn Phe Asn		
180	185	190
Pro Leu Cys Ala Ser Asp Gly Lys Ser Tyr Asp Asn Ala Cys Gln Ile		
195	200	205
Lys Glu Ala Ser Cys Gln Lys Gln Glu Lys Ile Glu Val Met Ser Leu		
210	215	220
Gly Arg Cys Gln Asp Asn Thr Thr Thr Thr Lys Ser Glu Asp Gly		
225	230	235
240		
His Tyr Ala Arg Thr Asp Tyr Ala Glu Asn Ala Asn Lys Leu Glu Glu		
245	250	255
Ser Ala Arg Glu His His Ile Pro Cys Pro Glu His Tyr Asn Gly Phe		
260	265	270
Cys Met His Gly Lys Cys Glu His Ser Ile Asn Met Gln Glu Pro Ser		
275	280	285
Cys Arg Cys Asp Ala Gly Tyr Thr Gly Gln His Cys Glu Lys Lys Asp		
290	295	300
Tyr Ser Val Leu Tyr Val Val Pro Gly Pro Val Arg Phe Gln Tyr Val		
305	310	315
320		
Leu Ile Ala Ala Val Ile Gly Thr Ile Gln Ile Ala Val Ile Cys Val		
325	330	335
Val Val Leu Cys Ile Thr Arg Lys Cys Pro Arg Ser Asn Arg Ile His		
340	345	350
Arg Gln Lys Gln Asn Thr Gly His Tyr Ser Ser Asp Asn Thr Thr Arg		
355	360	365

Ala Ser Thr Arg Leu Ile

370

<210> 2

<211> 1122

<212> DNA

<213> human embryonic brain

<400> 2

atggtgctgt	gggagtcccc	gcggcagtgc	agcagctgga	cactttgcga	gggcctttgc	60
tggctgcgtc	tgcgtccgt	catgctactc	atcgtagccc	gcccggtgaa	gctcgctgct	120
ttccctaccc	cctaagtga	ctgccaaacg	cccaccggct	ggaattgcic	tggttatgat	180
gacagagaaa	aigatctt	cctctgigac	accaacaccc	gtaaatttga	tggggaatgt	240
ttaagaattt	gagacactgt	gacttgcgtc	tgcagttca	agtgcaccaa	tgactatgt	300
ccttgtgtg	gctccaatgg	ggagagctac	cagaatgagt	gttacctgcg	acaggctgca	360
tgcaaacacg	agagtgagat	acttgggtg	tcagaaggat	catgtgccac	agatgcagga	420
tcaggatctg	gagatggagt	ccatgaaggc	tctggagaaa	ctagtcaaaa	ggagacatcc	480
acctgtgata	tttgcagtt	tggtgccagaa	tgcacgaaag	atgccgagga	tgtctgggt	540
gtgtgtata	ttgactgttc	tcaaaccac	ttcaatcccc	tctgcgttc	tgtatggaaa	600
tcttatgata	atgcatgcca	aatcaaagaa	gcatcggtc	agaaacagga	gaaaattgaa	660
gtcatgtctt	tgggtcgatg	tcaagataac	acaactacaa	ctactaagic	tgaagatgg	720
cattatgcaa	gaacagatta	tgcagagaat	gctaacaat	tagaagaaag	tgccagagaa	780
caccacatac	cttgtccgga	acattacaat	ggcttctgca	tgcatggaa	gtgtgaggcat	840
tcttatcaata	tgcaggagcc	atcttgcagg	tgtatgcgt	gttatactgg	acaacactgt	900
aaaaaaaaagg	actacagtgt	tctatacgtt	gttcccggtc	ctgtacgatt	tcaagtatgtc	960
ttaatcgac	ctgtgattgg	aacaatttcag	attgcgtgtca	tctgtgtggt	ggtcctctgc	1020
atcacaagga	aatgccccag	aagcaacaga	attcacagac	agaagcaaaa	tacagggcac	1080
tacagttcag	acaataacaac	aagagcgtcc	acgaggtaa	tc		1122

<210> 3

<211> 1721

<212> DNA

<213> human embryonic brain

<220>

<221> CDS

<222> (368)..(1489)

<400> 3

ctgcggggcg ccttgcactc ccctccaccc tgcctcctcg ggctccactc gtcgtcccc	60
ggactcccggt ctccctccgt cctccggctt cccagagcgc cctccctatg gcaggcagctt	120
cccgcgcttc cggcgcaagct tctcagcgga cgaccctctc gtcgggggc tgagccagtc	180
cctggatgtt gctgaaactc tcgagatcat ggcgggttt ggctgctgct tccccgcgg	240
gtgccactgc caccgcccgc gcctctgctg ccggcggtccg cggatgctc agtagccgc	300
tgcggggccc ccgcgatcct gtgttcctcg gaagccgtt gctgctgcag agttgcacga	360
actagtc atg gtg ctg tgg gag tcc ccg cgg cag tgc agc agc tgg aca	409

Met Val Leu Trp Glu Ser Pro Arg Gln Cys Ser Ser Trp Thr

1	5	10
---	---	----

ctt tgc gag ggc ttt tgc tgg ctg ctg ctg ccc gtc atg cta ctc	457		
Leu Cys Glu Gly Phe Cys Trp Leu Leu Leu Pro Val Met Leu Leu			
15	20	25	30

atc gta gcc cgc ccg gtg aag ctc gct gct ttc cct acc tcc tta agt	505		
Ile Val Ala Arg Pro Val Lys Leu Ala Ala Phe Pro Thr Ser Leu Ser			
35	40	45	

gac tgc caa acg ccc acc ggc tgg aat tgc tct ggt tat gat gac aga	553		
Asp Cys Gln Thr Pro Thr Gly Trp Asn Cys Ser Gly Tyr Asp Asp Arg			
50	55	60	

gaa aat gat ctc ttc ctc tgt gac acc aac acc tgt aaa ttt gat ggg	601		
Glu Asn Asp Leu Phe Leu Cys Asp Thr Asn Thr Cys Lys Phe Asp Gly			
65	70	75	

gaa tgt tta aga att gga gac act gtg act tgc gtc tgt cag ttc aag		649
Glu Cys Leu Arg Ile Gly Asp Thr Val Thr Cys Val Cys Gln Phe Lys		
80	85	90
tgc aac aat gac tat gtg cct gtg tgt ggc tcc aat ggg gag agc tac		697
Cys Asn Asn Asp Tyr Val Pro Val Cys Gly Ser Asn Gly Glu Ser Tyr		
95	100	105
cag aat gag tgt tac ctg cga cag gct gca tgc aaa cag cag agt gag		745
Gln Asn Glu Cys Tyr Leu Arg Gln Ala Ala Cys Lys Gln Gln Ser Glu		
115	120	125
ata ctt gtg gtg tca gaa gga tca tgt gcc aca gat gca gga tca gga		793
Ile Leu Val Val Ser Glu Gly Ser Cys Ala Thr Asp Ala Gly Ser Gly		
130	135	140
tct gga gat gga gtc cat gaa ggc tct gga gaa act agt caa aag gag		841
Ser Gly Asp Gly Val His Glu Gly Ser Gly Glu Thr Ser Gln Lys Glu		
145	150	155
aca tcc acc tgt gat att tgc cag ttt ggt gca gaa tgt gac gaa gat		889
Thr Ser Thr Cys Asp Ile Cys Gln Phe Gly Ala Glu Cys Asp Glu Asp		
160	165	170
gcc gag gat gtc tgg tgt gtg tgt aat att gac tgt tct caa acc aac		937
Ala Glu Asp Val Trp Cys Val Cys Asn Ile Asp Cys Ser Gln Thr Asn		
175	180	185
ttc aat ccc ctc tgc gct tct gat ggg aaa tct tat gat aat gca tgc		985
Phe Asn Pro Leu Cys Ala Ser Asp Gly Lys Ser Tyr Asp Asn Ala Cys		
195	200	205
caa atc aaa gaa gca tcg tgt cag aaa cag gag aaa att gaa gtc atg		1033
Gln Ile Lys Glu Ala Ser Cys Gln Lys Gln Glu Lys Ile Glu Val Met		
210	215	220
tct ttg ggt cga tgt caa gat aac aca act aca act act aag tct gaa		1081
Ser Leu Gly Arg Cys Gln Asp Asn Thr Thr Thr Lys Ser Glu		

225	230	235	
gat ggg cat tat gca aga aca gat tat gca gag aat gct aac aaa tta			1129
Asp Gly His Tyr Ala Arg Thr Asp Tyr Ala Glu Asn Ala Asn Lys Leu			
240	245	250	
gaa gaa agt gcc aga gaa cac cac ata cct tgt ccg gaa cat tac aat			1177
Glu Glu Ser Ala Arg Glu His His Ile Pro Cys Pro Glu His Tyr Asn			
255	260	265	270
ggc ttc tgc atg cat ggg aag tgt gag cat tct atc aat atg cag gag			1225
Gly Phe Cys Met His Gly Lys Cys Glu His Ser Ile Asn Met Gln Glu			
275	280	285	
cca tct tgc agg tgt gat gct ggt tat act gga caa cac tgt gaa aaa			1273
Pro Ser Cys Arg Cys Asp Ala Gly Tyr Thr Gly Gln His Cys Glu Lys			
290	295	300	
aag gac tac agt gtt cta tac gtt gtt ccc ggt cct gta cga ttt cag			1321
Lys Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Val Val Pro Gly Pro Val Arg Phe Gln			
305	310	315	
tat gtc tta atc gca gct gtg att gga aca att cag att gct gtc atc			1369
Tyr Val Leu Ile Ala Ala Val Ile Gly Thr Ile Gln Ile Ala Val Ile			
320	325	330	
tgt gtg gtg gtc ctc tgc atc aca agg aaa tgc ccc aga agc aac aga			1417
Cys Val Val Val Leu Cys Ile Thr Arg Lys Cys Pro Arg Ser Asn Arg			
335	340	345	350
att cac aga cag aag caa aat aca ggg cac tac agt tca gac aat aca			1465
Ile His Arg Gln Lys Gln Asn Thr Gly His Tyr Ser Ser Asp Asn Thr			
355	360	365	
aca aga gcg tcc acg agg tta atc taa agggagcatg tttcacagtg			1512
Thr Arg Ala Ser Thr Arg Leu Ile			
370			
gctggactac cgagagctt gactacacaa tacagtatta tagacaaaag aataagacaa			1572

gagatctaca catgttgcc tgcatttgtg gtaatctaca ccaatgaaaa catgtactac 1632
agctatattt gattatgtat ggatatattt gaaatagtat acattgtctt gatgttttt 1692
ctgtaatgt aataaactat ttatatcac 1721

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

tccggattc cgcccggtga agctcgctgc t 31

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

gctcgtcgac ttactgaaat cgtacaggac cgg 33

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

citcatccata tgcccccgtt gaagctcgct 30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

gattaactcg agctgaaatc gtacaggacc

30

<210> 8

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

tatgcgcccg gttaaagctgg ctgccttccc gaccctccctg agcgactgcc agactccca

59

<210> 9

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

cgggtgggag tctggcagtc gctcagggag gtcggaaag cagccagctt aaccgggcgc

60

a

61

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

gcttagttatt gctcagcggt ggc

23

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

gcctgccata tgcccccgt taagctggct

30

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

catcgaatgg tgcaaaacct ttc

23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04171

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ A61K38/18 // C21N15/12, C07K14/495

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ A61K38/18 // C21N15/12, C07K14/495

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), SwissProt, PIR, GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 96/36709, A1 (GENOME SCIENCE INC.), 21 November, 1996 (21. 11. 96), Abstract ; Page 20, lines 1 to 18, 48, 49 & EP, 826041, A1 & JP, 11-506908, A	1-5, 11-15
Y	WO, 91/02067, A1 (MAX PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN), 21 February, 1991 (21. 02. 91), Page 6, lines 4 to 29 ; Claims & EP, 484416, A & JP, 5-25056, A	1-5, 11-15
Y	CONNER, B. et al., The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain., Brain Research Reviews, June 1998, Vol. 27, No. 1, pp.1-39, Page 17, left column, line 29 to right column, line 2	1-5, 11-15

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier document but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 September, 1999 (28. 09. 99)Date of mailing of the international search report
12 October, 1999 (12. 10. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04171

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 5-161493, A (Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.), 29 June, 1993 (29. 06. 93), Claims ; page 24, right column, line 17 to page 26, left column, line 6 & WO, 91/03569, A & EP, 441947, A	1-5, 11-15
Y	JP, 9-308492, A (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), 2 December, 1997 (02. 12. 97), Par. Nos. [0231], [0341] & EP, 796913, A2 & US, 5831058, A	1-5, 11-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04171

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 6 to 10

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 6 to 10 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulation under the PCT, to search.

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl° A61K38/18//C21N15/12, C07K14/495

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl° A61K38/18//C21N15/12, C07K14/495

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAPLUS (STN), SwissProt, PIR, GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 96/36709, A1 (GENOME SCIENCE INC.) 21. 11月. 1996 (21. 11. 96) Abstract、第20ページ第1-18行、第48-49行 & EP, 826041, A1&JP, 11-506908, A	1-5, 11-15
Y	WO, 91/02067, A1 (MAX PLANCK-GESSELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN) 21. 2月. 1991 (21. 02. 91.) 第6ページ第4-29行、請求の範囲 & EP, 484416, A&JP, 5-25056, A	1-5, 11-15

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「I」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 09. 99

国際調査報告の発送日

12.10.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

渡邉下 浩一

4C 9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C(続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	CONNER, B. et al, The role of neuronal growth facteors in neurodegenerative disorders of the human brain., Brain Research Reviews, June 1998, Vol. 27, No. 1, pp. 1-39, 第17ページ左欄第29行-右欄第2行	1-5, 11-15
Y	JP, 5-161493, A (マックス・プランク・ゲゼルシャフト・ツール・フェルデルング・デル・ヴィッセンシャフテン・アイシングトラーゲナー・フェルайн) 29. 6月. 1993 (29. 06. 93) 特許請求の範囲、第24ページ右欄第17行-第26ページ左欄第6行 &WO, 91/03569, A&EP, 441947, A	1-5, 11-15
Y	JP, 9-308492, A (大塚製薬株式会社) 02. 12月. 1997 (02. 12. 97) 【0231】、【0341】 &EP, 796913, A2&US, 5831058, A	1-5, 11-15

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 6-10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 6-10 は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査期間が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。